

馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）

1 定義

馬ウイルス性動脈炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、凍結乾燥したもので、使用時にアルミニウムゲルアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

馬ウイルス性動脈炎ウイルス B-EFD 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

馬皮膚培養細胞及び RK-13 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、馬皮膚培養細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

馬皮膚培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に採取した培養液の遠心上清を濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥後、窒素ガスを充填し密封したものを小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個別培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調製した0.1vol%のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液をそれぞれに重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を希釈液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

RK-13細胞をプレートに2～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを、それぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、CMC重層培地（付記2）を重層し、37℃炭酸ガス下で4日間培養する。その後、CMC重層培地を除去し、ホルマリン加クリスタルバイオレット染色液（付記3）で培養細胞を固定染色し、ブラック数を測定する。

3.2.1.3 判定

培養細胞にブラックを認めたものを感染とみなし、PFUを算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{8.0}$ PFU以上でなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体5mLを、200倍量以上のリン酸緩衝液を用い、2～5℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

単層となったRK-13細胞を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料の全量を1mLにつき3cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記4）を加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは均質な懸濁液でなければならない。異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 pH測定試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.1vol%以下でなければならない。

3.4.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1.0mg 以下でなければならない。

3.4.7 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量法を準用して試験するとき、蛋白窒素の含有量は、1 mL 中 400 µg 以下でなければならない。

3.4.8 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.9.1.2 試験動物

約6週齢のハムスターを用いる。

3.4.9.1.3 培養細胞

単層となった RK-13 細胞を用いる。

3.4.9.1.4 中和試験用ウイルス

RK-13 細胞で増殖させた馬ウイルス性動脈炎ウイルス B-EFD 株を用いる。

3.4.9.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 10 匹の試験動物の腹腔内に 3 週間間隔で 2 回注射する。第 2 回目の注射後 7 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を希釈液で 5 倍に希釈し非働化した後、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清及びウイルス対照としての希釈液に等量の 0.1 mL 中約 60PFU の中和試験用ウイルス液を混合し、それぞれ 37 で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 穴の培養細胞に接種し、37 で 60 分間静置吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 5）を重層し、37 5 vol% 炭酸ガス下で 3 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、更に 24 時間培養し、ブラック数を測定する。

3.4.9.3 判定

被検血清のブラック数の平均値がウイルス対照のブラック数の平均値の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の 80 % 以上の中和抗体価が 10 倍以上であり、かつ、すべての試験動物の中和抗体価が、幾何平均値で 30 倍以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、4 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 希釈液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 CMC 重層培地

1,000mL 中

カルボキシメチルセルロースナトリウム塩 7.5 g

牛胎子血清 25 mL

5 倍濃縮イーグル MEM 200 mL

水 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 ホルマリン加クリスタルバイオレット染色液

A 液 クリスタルバイオレット液

1,000mL 中

クリスタルバイオレット 20 g

メタノール 残 量

B 液 緩衝ホルマリン液

1,000mL 中

ホルマリン 115 mL

酢酸ナトリウム三水和物 20 g

水 残 量

使用時に、A 液と B 液の割合が 1 対 9 となるように混合する。

付記 4 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛血清 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 5 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

寒天 10 g

牛血清 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v% のニューラルレッドを 2 vol % となるように加えたもの